

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA CRISTINA APOSTÓLICO CABRAL

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓXIDO DE COBRE
DOPADO COM ZINCO**

PONTA GROSSA

2022

LETICIA CRISTINA APOSTÓLICO CABRAL

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓXIDO DE COBRE DOPADO
COM ZINCO**

Study of the antimicrobial activity from the zinc doped copper oxide

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Quintino Pereira Marchesi

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Carolina De Oliveira Ribeiro

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa**



LETICIA CRISTINA APOSTÓLICO CABRAL

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓXIDO DE COBRE DOPADO
COM ZINCO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia

Data da aprovação: 21 de Dezembro de 2022

Dr. Luis Fernando Quintino Pereira, Doutorado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Marcio de Souza Goes, Doutorado – Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila)

Dr. Marcio Silva, Doutorado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dedico este trabalho ao meu parceiro Guilherme por
todo o apoio nessa jornada

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo apoio financeiro e como instituição provendo sempre o melhor ensino mesmo em tempos desafiadores.

Agradeço aos meus orientadores professores Luis Marchesi e Maria Carolina pelos ensinamentos durante toda essa jornada, pela paciência em sempre me ajudar e me orientar.

Agradeço a todos os alunos que fazem parte do laboratório de microbiologia que de alguma forma foram suporte pra mim nos longos dias de experimento

Agradeço a equipe da UTFPR pelo auxílio com amostras, equipamentos e dúvidas.

Agradeço aos professores da UTFPR por tudo que aprendi nas aulas e o auxílio mesmo em tempos tão difíceis e desafiadores que foram as aulas durante a pandemia.

Agradeço ao meu parceiro Guilherme por ter sido meu maior apoiador e a pessoa que mais acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditava, por ter ficado ao meu lado e entendido a importância do mestrado para mim.

Agradeço as minhas amigas: Gabriela, Amanda, Mariana, Laislla, Annie, Lola, Flávia, Juliana, por todo o apoio e compreensão da minha ausência como amiga durante esse período. Obrigado por estarem ao meu lado me motivando e me ouvindo sempre.

:

A educação é a arma mais poderosa que você
pode usar para mudar o mundo
(Nelson Mandela, 2003).

RESUMO

Com a rápida disseminação da resistência bacteriana, as infecções bacterianas, especialmente as infecções bacterianas resistentes a antibióticos, tornam-se um dos principais problemas para a saúde humana. Desta forma, a atividade antimicrobiana em relação a metais e óxidos metálicos tem sido cada vez mais explorada nos últimos anos, onde os óxidos metálicos podem induzir simultaneamente a destruição celular pelas paredes celulares e alvos intracelulares por meio de interações físicas, liberação de íons e geração de espécies reativas de oxigênio, que torna mais difícil para as bactérias desenvolverem resistência. Considerando isso, este estudo se propõe a correlacionar a influência da quantidade de zinco e da temperatura de calcinação na atividade antimicrobiana. Na síntese da resina precursora metálica foi utilizada uma razão molar de etilenoglicol/ácido cítrico/metálico (8/2/1 mol), com diferentes quantidades de zinco (2,5, 5,0 e 10,0 %). Para obter o óxido metálico, a resina resultante foi calcinada a 300 e 400 °C por 120 minutos. A atividade antimicrobiana foi testada primeiramente em um teste de triagem, onde as cepas 090 e 051 da *E. coli* foram testadas e a com melhor resultado de inibição (051) passou para a etapa de concentração mínima inibitória, apresentando atividade bactericida e bacteriostática, onde a concentração mínima inibitória apresentada foi de 6g/L para Zn 2,5% 8g/L para Cu 100% ambos a 300°C já para 400°C o resultado foi de 2g/L para o Zn 10% e 6g/L para o Cu 100% observando-se a influência da temperatura de calcinação e dopagem de zinco nos resultados.

Palavras-chave: bacteriostático; bactericida; dopagem; método de Pechini.

ABSTRACT

With the rapid spread of bacterial resistance, bacterial infections, especially antibiotic-resistant infections, become a major problem for human bacterial health. Thus, the antimicrobial activity towards metals and metal oxides has been increasingly explored in recent years, where metal oxides can simultaneously induce cell destruction by cell walls and intracellular targets through physical interactions, ion release and generation of reactive oxygen species, which makes it harder for bacteria to develop resistance. Considering this, this study proposes to correlate the influence of the amount of zinc and the calcination temperature on the antimicrobial activity. In the synthesis of the metallic precursor resin, a molar ratio of ethylene glycol/citric acid/metal (8/2/1 mol) was used, with different amounts of zinc (2.5, 5.0 and 10.0%). To obtain the metallic oxide, the resulting resin was calcined at 300 and 400 °C for 120 minutes. The antimicrobial activity was first tested in a trial test, where strains 090 and 051 of *E. coli* were tested and the one with the best inhibition result (051) passed to the minimum inhibitory concentration stage, showing bactericidal and bacteriostatic activity, where the minimum inhibitory concentration presented was 6g/L for Zn 2.5% 8g/L for Cu 100% both at 300°C and for 400°C the result was 2g/L for Zn 10% and 6g/L for Cu 100% observing the influence of calcination temperature and zinc doping on the results.

Keywords: bacteriostatic; bactericide; doping; Pechini method

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo que demonstra as principais classes de antibióticos descoberta durante os anos.....	16
Figura 2 - Estruturas cristalinas do: (a) Cu_2O e (b) CuO . As células unitárias estão mostradas nas linhas pontilhadas.....	23
Figura 3 - Fases cristalográficas do ZnO	24
Figura 4 - A) parâmetros essenciais das nanopartículas de ZnO na atividade bactericida e (b) diferentes mecanismos da atividade bactericida das nanopartículas de ZnO	25
Figura 5 - Estrutura do envelope celular das bactérias Gram negativas.....	28
Figura 6 - Mecanismo de ligação das nanopartículas de CuO na membrana celular da <i>E. coli</i> . (A) Atração eletrostática para nanopartículas de CuO não-funcionalizadas e (B) ligação covalente para as nanopartículas de CuO funcionalizadas com ácido borônico.....	29
Figura 7 - Difração de raios X das amostras em pó do óxido de cobre dopado com zinco em distinto tratamento térmico a (a) 300°C e (b) 400°C	34
Figura 8. Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura dos óxidos obtidos. (A) Cu 100% a 300°C , (B) Cu 100% a 400°C , (C) Zn 2,5% a 300°C , (D) Zn 2,5% a 400°C , (E) Zn 5,0% a 300°C , (F) Zn 5,0% a 400°C , (G) Zn 10% a 300°C e (H) Z	36
Figura 9 - Placas contendo o agente bactericida e seus respectivos resultados demonstrando que todos os compostos apresentaram halo de inibição, a área do halo é representada pelo círculo vermelho.....	38
Figura 10 - Representação gráfica da diferença entre bactericida e bacteriostático.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características gerais dos organismos multirresistentes a fármacos, demonstrando o organismo que afeta, as infecções comuns, as resistências a antibióticos e as drogas consideradas para tratamento.....	18
Quadro 2 - Quadro demonstrando os óxidos e seus respectivos mecanismos de ação e as bactérias que são afetadas por eles.....	21
Quadro 3 - Diâmetro do halo de inibição para as diferentes cepas da <i>E. Coli</i> e concentrações do óxido de cobre dopado com zinco.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela demonstrando a massa utilizada dos reagentes que compõe o óxido de cobre e o óxido de cobre dopado com zinco.....	30
Tabela 2 - Demonstração do range de concentrações e suas respectivas massas e volumes.....	32
Tabela 3 - Porcentagem em massa (wt%) das fases presentes nas amostras....	35
Tabela 4 - Resultados obtidos a partir do método de contagem das células totais para os óxidos com tratamento térmico a 300°C.....	40
Tabela 5 - Resultados obtidos a partir do método de contagem das células totais para os óxidos com tratamento térmico a 400°C.....	40
Tabela 6 - Concentração mínima inibitória para os óxidos com tratamento térmico a 300 e 400°C.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
NPs	Nanopartículas
CMIB	Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico
CMRP	Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense

LISTA DE SÍMBOLOS

Cu	Cobre
Zn	Zinco
CuO	Óxido de cobre
ZnO	Óxido de zinco
TiO ₂	Dióxido de titânio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Antibióticos	16
3.1.1 Resistência a Antibióticos	17
3.2 Nanotecnologia	19
3.3 Nanopartículas metálicas	20
3.3.1 Atividade Bactericida das Nanopartículas Metálicas	20
3.4 Óxido de cobre	22
3.5 Óxido de zinco	23
3.6 Métodos de síntese dos óxidos metálicos	26
3.6.1 Método de Pechini	26
3.7 <i>Escherichia coli</i>	27
4 METODOLOGIA	30
4.1 Síntese do óxido de cobre dopado com zinco	30
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	31
4.2.1 Triagem por difusão em ágar	31
4.2.2 Concentração mínima inibitória	32
4.3 Análises de caracterização do óxido de cobre dopado com zinco	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Difração de raios x	34
5.2 Microscopia eletrônica	36
5.3 Atividade antimicrobiana	37
5.3.1 Concentração mínima inibitória	39
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A resistência das bactérias aumentou com a popularização dos antibióticos, e com isso sua eficácia diminuiu de certa forma. Além disso, o surgimento das superbactérias resistentes aos antibióticos se tornou um problema preocupante para a saúde pública, onde em 2017, vinte e três mil mortes aconteceram em decorrência das bactérias resistentes (CIEVS, 2017). Segundo um relatório comissionado pelo governo britânico a resistência bacteriana pode levar a óbito em torno de dez milhões de pessoas até 2050 (O'NEILL, 2016). Vendo o quanto essa problemática afeta a saúde pública, é fundamental propor uma alternativa com maior efetividade, surgindo a hipótese da utilização dos compostos metálicos. Diferente dos antibióticos que atacam as bactérias através de um único aparato de defesa, os compostos metálicos podem induzir a morte celular a partir de vários mecanismos, e isso aumenta a eficácia à resistência bacteriana (MI *et al*, 2018), sendo o uso de compostos metálicos então uma alternativa que pode trazer ganhos à essa área.

Apesar de haver vários estudos com os compostos metálicos agindo como bactericidas quanto a seu uso como medicamento, esses estudos foram todos *in vitro*, nunca tendo sido realizados em seres humanos, então voltando ao problema que seria essa resistência bacteriana e como afeta a saúde pública, nota-se que as lacunas deste estudo seriam criar um material eficaz que não fosse tóxico quando em contatos com humanos. Com vastos campos de aplicação para os compostos metálicos, com a ascensão da nanotecnologia, tem-se alternativas de como aplicar os compostos em um produto que ajude igualmente a questão da saúde pública, principalmente nas infecções hospitalares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antimicrobiana do óxido de cobre dopado com zinco.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese do óxido de cobre dopado com zinco pelo método de Pechini;
- Caracterizar os óxidos por difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura;
- Estudar a influência dos parâmetros de síntese, tais como, temperatura e teor de zinco nas propriedades físicas dos óxidos;
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos óxidos obtidos frente a linhagens de *Escherichia coli*.

Os antibióticos são classificados com base no seu mecanismo de ação, onde temos: inibição da síntese da parede celular ou membrana celular (penicilina, cefalosporina, monobactâmicos, polimixinas), inibição da síntese de ácidos nucleicos como RNA e DNA (quinolonas, rifampicina, trimetoprima) e inibição da síntese proteica das subunidades 30S e 50S (macrólidos, tetraciclinas, linezolida) (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

E é importante ressaltar que grande parte dos antibióticos tem a sua ação centrada em apenas um tipo de mecanismo de cada vez (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).

3.1.1 Resistência a Antibióticos

Em decorrência da redução na identificação de novas classes de antibióticos nos últimos 50 anos e com a popularização do uso de antibióticos que levou ao acúmulo de patógenos durante os anos, surgiu a crise de resistência antimicrobiana em inglês conhecida como *Antimicrobial resistance crisis* (AMR). A organização mundial da saúde introduziu uma lista de patógenos críticos resistente a fármacos, as Enterobacteriaceae (*Escherichia. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*), as *Pseudomonas aeruginosa* e a *Acinetobacter baumannii* são consideradas um problema para a saúde mundial por se tratarem de bactérias que causam graves infecções que podem ser letais como a pneumonia e infecções que atingem a corrente sanguínea. Além disso, todos os patógenos críticos são bactérias Gram-negativas. (LEWIS, 2020)

A resistência aos antibióticos pode acontecer de diversas formas como modificação no alvo, mudança de um alvo para outro, efluxo que pode expelir o antibiótico da célula, penetração restrita e até a destruição do antibiótico. Pensando no aspecto molecular, a resistência pode ser atribuída a mutações cromossômicas, mas também associada com elementos extra cromossômicos do ambiente adquiridos pela bactéria como segmentos de DNA móvel, plasmídeos e transposons. A presença das β -lactamases são um tipo de determinantes para a resistência, uma vez que resistem a antibióticos que contém a β -lactam. No Quadro 1 pode-se observar uma tabela com características de organismos multirresistentes a fármacos (ALEKSUN; LEVI, 2007)

Quadro 1. Características gerais dos organismos multirresistentes a fármacos, demonstrando o organismo, as infecções comuns, as resistências a antibióticos e os fármacos considerados para tratamento.

Organismo	Infecções comuns	Resistência a antibióticos chave	Drogas consideradas para tratamento dos MDR*
<i>P. aeruginosa</i>	Pulmão, ferimentos	β -lactam, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos	Colistin
<i>Acinetobacter spp</i>	Pulmão, ferimentos, ossos, sangue	β -lactam, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos	Colistin, tigeciclina
<i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> carregando extensos espectros β -lactamases	Urinária, biliar, trato gastrointestinal, pulmão, sangue	β -lactam, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos	Colistin (para <i>K. pneumoniae</i>), tigeciclina
<i>Enterococci</i> resistente a vancomicina	Sangue, coração, intra-abdominal	Vancomicina	Quinupristina-dalfopristina, linezolida, daptomicina
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	Pele e tecidos, trato respiratório, sangue	β -lactam, fluoroquinolonas, macrolídeos	Quinupristina-dalfopristina, linezolida, daptomicina, tigeciclina, vancomicina
<i>S. pneumoniae</i> resistente a múltiplas drogas	Ouvido, pulmão, sangue, fluido cerebroespinal	β -lactam, macrolídeos, tetraciclina, cotrimoxazol	Fluoroquinolonas, tigeciclina
<i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistente a drogas	Pulmão	Rifampina, isoniazida, e os três dos seguintes: aminoglicosídeos, polipeptídeos, fluoroquinolonas, tioamidas, cicloserina, ou ácido para-aminosalicílico	Agentes de terceira linha, combinações de drogas
*Agentes que foram aprovados para uso pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA), tem mostrado utilidade no tratamento de infecções, ou exibiram atividade promissora in vitro e aguarda a determinação de eficácia clínica			

Fonte: adaptada de Aleksun; Levi, (2020)

A maioria dos antibióticos tem a sua ação centrada em apenas um tipo de mecanismo para atacar as bactérias, sendo que cada antibiótico tem um foco em único local de ação, por exemplo: inibição da síntese na parede celular, ação na membrana celular, ação no nível ribossômico da síntese proteica e inibição da síntese do ácido nucleico, o que resulta na morte celular. (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010) (SANTOS *et al.*, 2018)

Quando pensamos na saúde pública vemos que a resistência aos antibióticos é um grande problema, principalmente quando entramos na problemática das infecções hospitalares, atualmente conhecidas como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (NASCIMENTO; ANDRADE, 2018), relacionando-as com

os microrganismos multirresistentes a drogas vemos que elas abrangem 65% das infecções hospitalares, sendo não só um perigo para pacientes, já que aumentam a mortalidade, mas também sendo um problema para a saúde já que pode acarretar em custos extras (NEUBESIER *et al.*, 2020).

Com um mecanismo de ação limitado e uma grande variedade de resistências bacterianas aos antibióticos, uma alternativa eficaz é de fundamental importância no controle das infecções.

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um tema atual que vem trazendo inovações para áreas como agricultura, processamento de alimentos, técnicas medicinais e até de compostos para tecidos. Onde basicamente considera-se a síntese e caracterização de compostos que estejam dentro da região do nanômetro quando falamos de tamanho de partícula (1–100 nm) (SIRELKHATIM *et al.*, 2015). Ela opera no primeiro nível de organização dos átomos e tem a habilidade promissora de construir componentes de tamanho molecular, ela é compreendida como a habilidade de controlar e entender num nível de átomos individuais e moléculas (YADAV, 2013).

Nas últimas duas décadas foi possível o desenvolvimento de vários materiais e produtos providos da nanotecnologia, assim como também entender o campo com mais clareza. Esses produtos abrangem diversas áreas como farmacêutica, cosmética, embalagens, construções entre outros. Como exemplos de produtos já elaborados tem um protetor solar com nanopartículas de óxido de zinco para evitar queimaduras, também tem os nano filmes com as mais variadas aplicações, desde um filme repelente à água e antineblina, como também com atividade bactericida (YADAV, 2013).

Nanopartículas (NPs) de óxido de cobre tem sido usadas em hospitais como agentes antimicrobianos devido a sua habilidade de destruição de até 99,9% de bactérias Gram-positivas e negativas onde elas também podem ser utilizadas em lençóis para leitos hospitalares, e o uso das NPs nesse ambiente tem diminuído a ocorrência de infecções hospitalares (HALBUS; HOROZOV; PAUNOV, 2019). Devido a sua alta reatividade e grande área superficial as NPs também tem se mostrado

promissoras no tratamento e purificação de água agindo como agente bactericida. (HARIKUMAR; ARAVIND, 2016).

3.3 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas tem atraído muita atenção da área científica nos últimos anos, sendo um campo de interesse devido ao seu potencial tecnológico, podendo ser utilizadas em áreas como a biomedicina e as engenharias. Uma característica importante das NPs metálicas é a capacidade que o material possui de ser sintetizado e conjugado com, por exemplo, alguns fármacos e até anticorpos, demonstrando um grande potencial de aplicações na área da biotecnologia (MODY *et al.*, 2010).

Para serem consideradas NPs, o seu tamanho deve estar na escala entre 1 e 100 nm. As partículas com essa dimensão podem ter uma interação com biomoléculas nas superfícies das células e dentro das células, resultando em propriedades bioquímicas e químicas interessantes (MODY *et al.*, 2010).

Alguns exemplos de nanopartículas metálicas são os óxidos metálicos, como por exemplo o óxido de prata (AgO), óxido de ouro (Au₂O₃), dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zinco (ZnO), óxido de magnésio (MgO) e o óxido de cobre (CuO) (MI *et al.*, 2018). Estes compostos podem ter várias áreas de aplicações como inibição do crescimento de células cancerígenas (YUAN *et al.*, 2016) e redução da formação de biofilme e de infecções bacterianas (MI *et al.*, 2018).

3.3.1 Atividade Bactericida das Nanopartículas Metálicas

Desde os tempos antigos, aproximadamente 4.000 anos a.C. (antes de Cristo), compostos metálicos como a prata vem sendo utilizados para tratamento e prevenção de infecções, no entanto, suas aplicações medicinais foram documentadas somente a partir dos séculos 17 e 18. Encontra-se também aplicações da prata na descontaminação de reservatórios utilizados pelos egípcios (POLITANO *et al.* 2013). MI *et al.* (2018) mostraram que um dos motivos para essa grande ação bactericida é sua grande área superficial que contribui na alteração de atividade biológica.

Quando a morte celular é considerada, a maneira como as nanopartículas agem é diferente dos antibióticos, começando pelo fato de que as NPs podem induzir a morte celular através de múltiplos mecanismos simultâneos, e ainda podem atingir simultaneamente os alvos na parede celular e alvos intracelulares a partir de interações físicas, liberação de íons e a geração de espécies de oxigênio reativo (ROS). Sendo assim, frente a essa variedade no mecanismo de ação bactericida, as bactérias encontram uma grande dificuldade para gerar resistência as NPs (MI *et al.*, 2018). O Quadro 2 apresenta as características destes mecanismos e a relação com cada óxido.

Quadro 2. Quadro demonstrando os óxidos e seus respectivos mecanismos de ação e as bactérias que são afetadas por eles.

Óxidos	Mecanismo de Ação	Fatores que afetam a atividade antimicrobiana	Bactérias
Ag	Liberação de Ag ⁺ Fotocatalítica Ruptura da membrana celular	Tamanho de partícula Formato Concentração	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TiO₂	Fotocatalítica Ruptura da membrana celular	Tamanho de partícula Concentração Cristalinidade Funcionalização	<i>Staphylococcus aureus</i>
Au₂O₃	Fotocatalítica Inibição da síntese do RNA Ruptura da membrana celular	Tamanho de partícula Formato Concentração Rugosidade Funcionalização	<i>Escherichia coli</i>
Fe₂O₃	Fotocatalítica	Tamanho de partícula Magnetismo Funcionalização	<i>Escherichia coli</i>
ZnO	Fotocatalítica Liberação de íons Zn ²⁺	Tamanho de partícula Concentração	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>

Fonte: adaptada de Mi *et al.*, (2018)

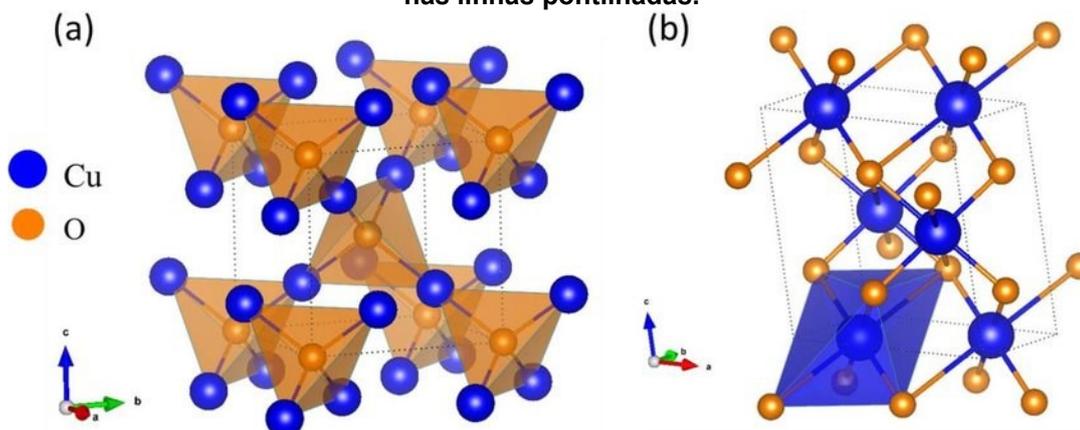
Alguns fatores são importantes no desempenho das nanopartículas metálicas na ação antimicrobiana, como por exemplo, tamanho de partícula, formato, rugosidade e cristalinidade. Neste sentido, uma vez que esses fatores podem ser ajustados através do método de síntese, a escolha dele se torna essencial nas propriedades das nanopartículas metálicas. Dentre os vários métodos de síntese de nanopartículas metálicas, destacam-se os métodos de Pechini: formação de quelatos entre cátions metálicos com um ácido hidro carboxílico (SOUZA *et al.*, 2021), Sol-gel:

consiste na conversão de uma solução precursora em um sólido inorgânico onde ocorrem as reações de hidrólise e condensação do precursor para a formação do sol (partículas coloidais) e gel (rede tridimensional). (BRITO ANTON; ALMEIDA BRAGA, 2015) (ANTECKA *et al.* 2018), Sonoquímico: método que permite preparar materiais nanoestruturados a partir da radiação do ultrassom (GUO *et al.*, 2011), Eletrofiação: uma elevada tensão elétrica é aplicada a ponta ou agulha em uma seringa contendo uma solução polimérica (COSTA *et al.*, 2009) e Hidrotermal: método que converte energias vibracionais e rotacionais em energia térmica a partir da alta radiação (KLAPISZEWSKI *et al.*, 2019).

3.4 Óxido de cobre

O óxido de cobre (CuO) é um composto semiconductor do tipo p (bandgap indireto de 1,2 eV e bandgap direto de 3,2 – 3,3 eV), é quimicamente estável, abundante e barato, por isso, CuO tem atraído uma atenção especial dos pesquisadores porque é o composto mais simples da família de compostos de cobre, e por exibir uma variedade de propriedades físicas, tais como, supercondutividade em altas temperaturas, efeitos de correlação eletrônica e dinâmica de spin, pode ser empregado nas áreas de sensores e catálise. A síntese do CuO é relativamente simples e de baixo custo, é um composto facilmente misturado com líquidos polares e polímeros, e relativamente estável em termos de propriedades químicas e físicas (ALLAKER, 2012) (MERSIAN *et al.* 2018). Na **Figura 2** estão apresentadas as estruturas cristalinas do CuO e do Cu₂O.

Figura 2. Estruturas cristalinas do: (a) Cu_2O e (b) CuO . As células unitárias estão mostradas nas linhas pontilhadas.



Fonte: Rajeshwar *et al.*, 2018.

Em geral, nanoparticulados metálicos são altamente iônicos, o que leva os óxidos metálicos a apresentarem atividade antimicrobiana. Dentro deste contexto, o CuO se destaca, pois pode ser preparado com distintas morfologias e altas áreas superficiais (MERSIAN *et al.*, 2018). Kubiak *et al.* (2019) sintetizaram um óxido binário composto por TiO_2 e CuO . O método permitiu obter estruturas cristalinas dos dois compostos, ou seja, estruturas com orientação anatásia para o TiO_2 e monoclinica para o CuO . Além disso, também foi obtido TiO_2 na forma de esferas e CuO na forma de nanofolhas. O sistema binário apresentou uma boa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* o que significa que houve uma boa inibição no crescimento bacteriano (JIA *et al.*, 2019). Na mesma linha, Nishino *et al.* testaram a atividade antimicrobiana de nanoflores de CuO , sintetizado por um método verde, contra as bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli* K12). Os autores relataram uma alta atividade antimicrobiana das nanoflores de CuO que dependem da capacidade de produção de ROS das distintas amostras estudadas.

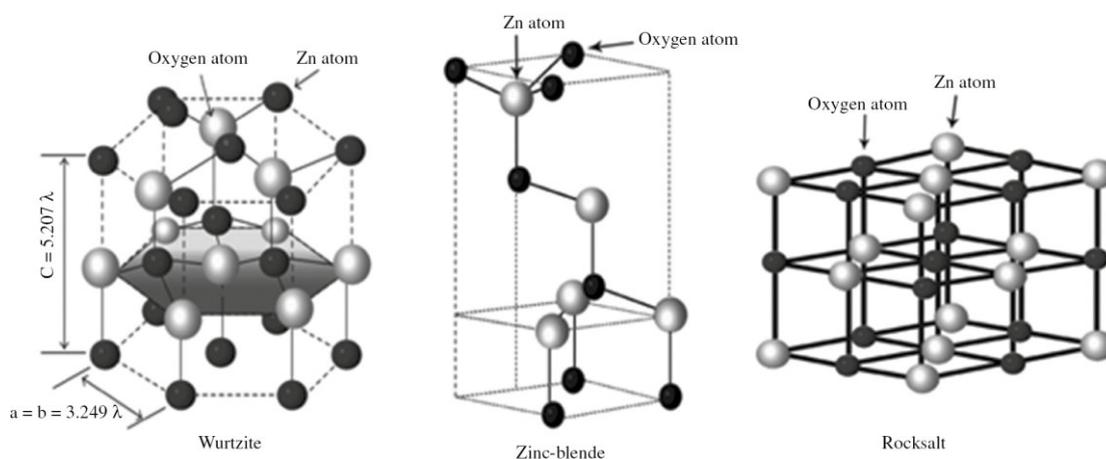
3.5 Óxido de zinco

O óxido de zinco (ZnO) é um material inorgânico funcional, estratégico, promissor e versátil com uma variada possibilidade de aplicação (WANG; ZHAO 2006). É conhecido como semicondutor II-VI, uma vez que zinco e oxigênio estão nas famílias 2A e 6A, respectivamente, da tabela periódica (NEUMARK; GONG;

KUSKOVSKY, 2006). ZnO apresenta propriedades das mais variadas, como por exemplo, ópticas, de sensores, semicondutoras, condutividade elétrica e piezoelétrica (KHAN, 2006). Apresenta um bandgap de 3,3 eV no espectro do UV próximo, uma alta energia de ligação excitônica (60 meV) em temperatura ambiente (ZHANG *et al*, 2012) (SCHMIDT-MENDE; MACMANUS-DRISCOLL, 2007), e uma condutividade elétrica natural do tipo n (CHAMPI; MARQUES, 2006). O relativo alto valor do bandgap do ZnO tem efeito significativo nas suas propriedades, como a condutividade elétrica e absorção óptica. A sua emissão excitônica pode ser mantida alta à temperatura ambiente e a sua condutividade pode ser aumentada pela dopagem com outros metais (JANOTTI; VAN DE WALLE, 2009).

Nanopartículas de ZnO podem apresentar as mais variadas morfologias e fases cristalográficas (Figura 3), o que se torna muito interessante na sua aplicação como material antimicrobiano, e é por isso que ele vem sendo amplamente estudado nos últimos anos. Ele apresenta atividade tanto na micro quanto na nanoescala, no entanto, sua atividade significativa é quando se apresenta como nanopartículas, uma vez que nesta escala ele pode interagir melhor com a superfície quando entra na célula bacteriana, apresentando assim um mecanismo distinto de ação bactericida (WEBSTER; SEIL, 2012). Além disso, uma característica que torna as nanopartículas de ZnO ainda mais interessante é que elas não apresentam toxicidade contra células humanas, garantindo assim a biocompatibilidade, o que reforça ainda mais o seu uso como agente antimicrobiano (COLON; WARD; WEBSTER, 2006).

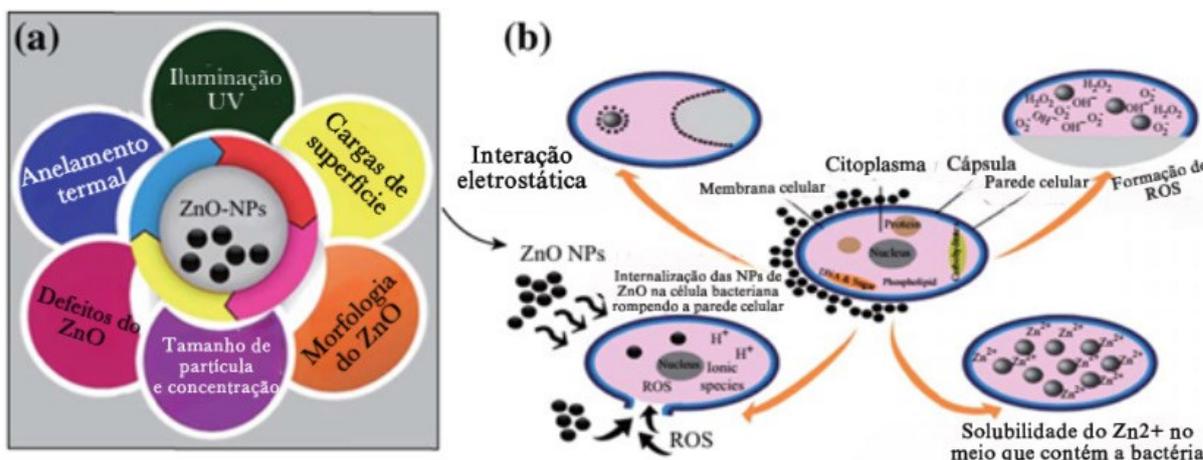
Figura 3. Fases cristalográficas do ZnO.



Fonte ALI; PHUL; ZIA, 2018.

Os principais mecanismos propostos para a atividade bactericida das nanopartículas de ZnO são: (i) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), (ii) a liberação de íons zinco (Zn^{2+}) e (iii) inibição da energia do metabolismo (SIRELKHATIM *et al*, 2015) (Figura 4).

Figura 4. a) Parâmetros essenciais das nanopartículas de ZnO na atividade bactericida e (b) diferentes mecanismos da atividade bactericida das nanopartículas de ZnO.



Fonte: Adaptado de Sirelkhatim *et al*, 2015.

A toxicidade das ROS para as bactérias é atribuída a sua alta reatividade e propriedades oxidativas. Foi reportado que suspensões aquosas de nanopartículas de ZnO produzem uma quantidade considerável de ROS, além disso, outros estudos mostram também que a não-toxicidade das nanopartículas de ZnO é devido à alta produção de ROS que, de certa maneira, é considerado o principal mecanismo da atividade bactericida dessas nanopartículas (RAGHUPATHI; KOODALI; MANNA, 2011). Outro mecanismo muito proposto também é o da liberação de íons zinco (Zn^{2+}), que tem efeito significativo na inibição do transporte ativo, bem como no metabolismo de aminoácidos e na disrupção do sistema enzimático (Song *et al*, 2010) (SEVINÇ; HANLEY, 2010). A liberação das espécies Zn^{2+} mostrou-se dependente do tamanho das nanoestruturas, neste sentido, a taxa de liberação e a toxicidade das nanopartículas de ZnO depende do tamanho e morfologias das nanopartículas (HEINLAAN *et al*, 2008) (WONG *et al*, 2009). Já a inibição da energia do metabolismo é considerada uma vez que as nanopartículas de ZnO levam a disfunção da membrana pela sua ruptura, resultando em sua internalização nas bactérias. Essa internalização é dependente do tamanho da partícula, propriedades superficiais, defeitos e funcionalização, e leva a uma diminuição dos níveis de adenosina trifosfato

e da energia da molécula, o que gera uma desestabilização da membrana externa (ASHE, 2011). Outras propriedades como sua seletividade, resistência ao calor e durabilidade o faz eficiente contra bactérias como *E. coli* e *S. aureus*. Quando reduzido a nanopartícula a sua eficiência aumenta ainda mais podendo combater até bactérias multirresistentes a drogas (SILVA *et al.*, 2019). Para se obter a sua partícula um método de síntese é necessário. (ANTECKA *et al.*, 2018)

3.6 Métodos de síntese dos óxidos metálicos

Diversos métodos podem ser utilizados para a sintetização dos óxidos, dentre eles temos: método sol-gel (ANTECKA *et al.*, 2018); irradiação por micro-ondas; hidrotermal; Pechini (MERSIAN *et al.*, 2018); co-precipitação; mecanoquímico (LV *et al.*, 2020) e método de síntese de soluções químicas (SCS) (CRETU *et al.*, 2016);. A escolha de cada método varia com o resultado que se espera no óxido formado, uma vez que a síntese influencia nas características finais como a atividade bactericida por exemplo (MERSIAN *et al.*, 2018). Os métodos comumente mais utilizados em trabalhos são o método sol-gel, co-precipitação e o método mecanoquímico (LV *et al.*, 2020). Por se tratar de uma rota de sintetização simples (MERSIAN *et al.*, 2018) o método de Pechini foi o escolhido para este trabalho.

3.6.1 Método de Pechini

Segundo Pechini (1967) o método se consiste na formação de quelatos de cátions a partir da dissolução de sais metálicos numa solução aquosa contendo um ácido hidroxicarboxílico e vários sais metálicos podem ser utilizados nesse método como: cloretos, nitratos, carbonatos, citratos e nessa dissolução mistura-se um álcool poli-hidroxilado que sob aquecimento os componentes devem ser completamente solubilizados obtendo então uma solução translúcida. Essa solução deve passar por um tratamento térmico posteriormente com temperaturas entre 120 a 250°C onde esse tratamento será responsável pela esterificação entre o álcool e o ácido hidroxicarboxílico. Devido ao álcool e o ácido serem polifuncionais ocorre a formação de uma resina polimérica onde os cátions quelados estão distribuídos ao longo da

estrutura molecular da resina. Para se obter o óxido metálico em pó outro tratamento térmico é necessário onde a temperatura do tratamento influencia diretamente as propriedades físicas do composto. A vantagem do método de Pechini é que ele permite a distribuição dos cátions por toda a estrutura do polímero, produzindo assim um pó com grande homogeneidade. (PECHINI, 1967)

Alguns trabalhos mostraram sucesso do método de Pechini como método de sintetização para óxidos com atividade antimicrobiana, como no trabalho de Rodrigues *et al.* (2013) onde foram testadas nanopartículas a base de zircônia e prata com um efeito antibacteriano positivo contra a *Staphylococcus Aureus*. Já Morais, (2019) produziu uma solução de (Mg,Zn) 2SnO_4 a partir do método de Pechini e testou contra a bactéria *E. coli* tendo um bom resultado quanto a atividade antimicrobiana apresentando algum tipo de inibição em todos os testes.

3.7 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) pertence à família das *Enterobacteriaceae* e é um dos comensais que mais comumente habita o trato gastrointestinal de humanos e outros animais. Ela conta com características peculiares como a facilidade no manuseio, crescimento em condições aeróbicas e anaeróbicas e a disponibilidade de um completo sequenciamento genômico que a torna um microrganismo interessante para a biotecnologia sendo usada em diversas aplicações desde a área médica até a industrial. (ALLOCATI *et al.*, 2013)

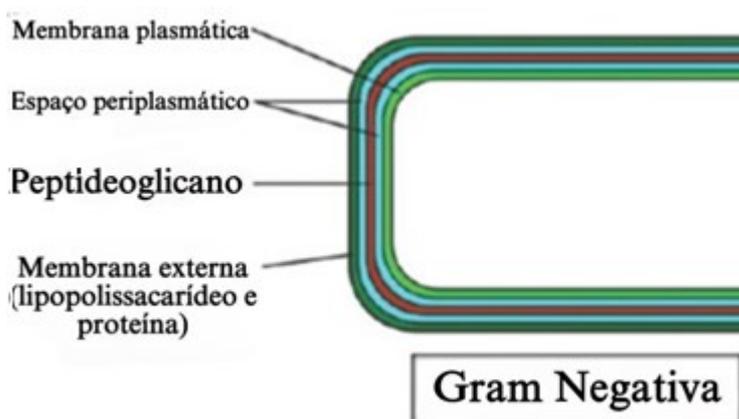
Apesar de ser importante para a flora intestinal dos seres humanos a *E. Coli* pode causar diversas doenças devido à presença de vários patótipos na sua composição, onde pelo menos seis deles podem causar doenças entéricas como diarreia e disenteria, mas também pode causar doenças que atingem outros lugares além do trato intestinal como a infecção do trato urinário e meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A composição celular da *E. coli* consiste em quatro elementos: o citoplasma, o periplasma, a membrana interna e a membrana externa, onde essas membranas tem diferentes componentes. Sendo a membrana interna composta por proteínas α -helicoidais e fosfolípidios reunidos em uma bicamada. A membrana externa também

é composta por uma bicamada assimétrica de glicolipídios que contém as proteínas β -barrel e fosfolipídios (ROWLETT *et al.*, 2017).

Por se tratar de uma bactéria Gram negativa a *E. coli* conta com uma estrutura macromolecular que tem a função de barreira de permeabilidade onde essa barreira protege as células (ROWLETT *et al.*, 2017). A sua parede celular se situa externamente a membrana citoplasmática e é composta por rede porosa que se assemelha a uma malha de peptideoglicano além de uma molécula de oligopeptídeo e a função dessa parede é dar forma, proteção e rigidez à célula (GUMBART *et al.*, 2014). Sua estrutura pode ser vista de uma forma mais explicativa na **Figura 5**

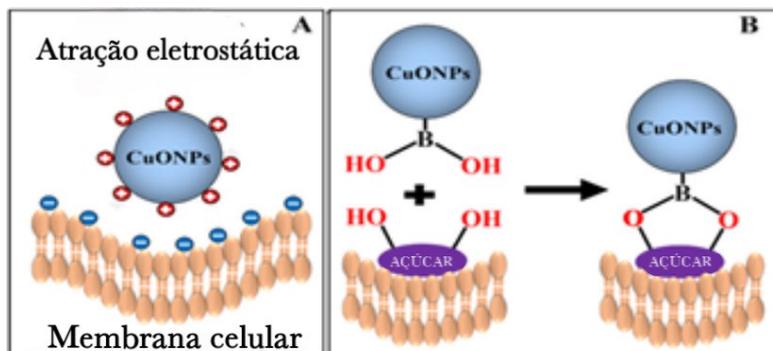
Figura 5. Estrutura do envelope celular das bactérias Gram negativas.



Fonte: Adaptado de KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN (2017)

A membrana celular da *E. coli* apresenta uma carga superficial negativamente carregada, enquanto que as nanopartículas de CuO não-funcionalizadas apresentam uma carga positiva. Quanto à sua interação com NPs metálicas, especialmente as de CuO a *E. coli* existe uma interação eletrostática da membrana celular com as NPs de CuO não-funcionalizadas que podem se ligar eletrostaticamente na superfície da célula bacteriana e também as suas glicoproteínas e carboidratos presentes na parede celular se ligam covalentemente com as NPs (HALBUS; HOROZOV; PAUNOV, 2019). Na Figura 6 podemos observar essa interação:

Figura 6. Mecanismo de ligação das nanopartículas de CuO na membrana celular da *E. coli*. (A) Atração eletrostática para nanopartículas de CuO não-funcionalizadas e (B) ligação covalente para as nanopartículas de CuO funcionalizadas com ácido borônico.



Fonte: Adaptado de Halbus; Horozov; Paunov (2019)

4 METODOLOGIA

Os experimentos executados foram divididos em duas partes: a síntese e a avaliação da atividade antimicrobiana.

4.1 Síntese do óxido de cobre dopado com zinco

Na etapa de síntese, para se obter o óxido de cobre dopado com zinco foi utilizado o método de Pechini, o experimento nessa etapa foi então, realizado da seguinte maneira: foram utilizados os reagentes etilenoglicol, ácido cítrico, nitrato de cobre e nitrato de zinco, onde são medidos numa proporção molar de 8:2:1 mol, respectivamente, e o nitrato de zinco foi adicionado conforme a porcentagem desejada para cada parâmetro que foi estudado (2,5%, 5% e 10%).

Para o preparo do óxido de cobre puro, inicialmente foi pesado 20g de etilenoglicol, 15,47g de ácido cítrico e 9,93g de nitrato de cobre. Para a massa das soluções que contém as dopagens de zinco a massa de etilenoglicol e ácido cítrico permaneceram a mesma que a anterior, entretanto para cada porcentagem a massa do nitrato de cobre e nitrato de zinco mudou (Tabela 1).

Tabela 1. Massa utilizada dos reagentes que compõe o óxido de cobre e o óxido de cobre dopado com zinco

	Etilenoglicol	Nitrato de Cobre	Ácido cítrico	Nitrato de Zinco
CuO	20g	9,93g	15,47g	-
Zn 2,5%	20g	9,68g	15,47g	0,312g
Zn 5%	20g	9,43g	15,47g	0,624g
Zn 10%	20g	8,93g	15,47g	1,248g

Fonte: Autoria própria (2022)

Para combinar esses reagentes eles foram completamente dissolvidos sob agitação no agitador magnético em banho maria mantendo a temperatura de 60°C, sendo colocados um a um na seguinte sequência: etilenoglicol-nitrato de cobre-ácido cítrico e caso tenha a dopagem de zinco, o nitrato de zinco. Após a formação da resina ela foi levada para a queima onde formou óxido, a resina passou o período de 1 hora a 120°C e logo após um período de 2 horas a 300/400°C. Após a queima da resina foi

realizada a sua moagem manual com o pistilo. Os óxidos obtidos foram armazenados em temperatura ambiente.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do óxido foi dividida em duas etapas: triagem por difusão em ágar e concentração mínima inibitória.

Para a realização da atividade antimicrobiana foram empregadas as linhagens de *Escherichia coli* CMIB 090 (CMRP3249) e CMIB 051 (CMRP3210), cedidas pela Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR campus Ponta Grossa – PR, onde essas bactérias provenientes das Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense que tem sede em Curitiba – PR.

4.2.1 Triagem por difusão em ágar

O método foi adaptado de (ARAB, 2018) e (ANVISA, 2008), onde foram testadas ambas as linhagens de *E. coli* frente as amostras de óxido. Para tal, uma suspensão da linhagem foi padronizada para o ponto 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL) por meio de uma solução estéril salina 0,85%, em seguida foi espalhada 100 μ L em placas contendo ágar Brain Heart Infusion (BHI)

Após o inóculo secar, uma massa de 0,0154g de óxido de cobre e os óxidos de cobre dopados com zinco foram depositados nas placas que em seguida foram incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. A atividade antimicrobiana foi medida avaliando a formação do halo de inibição.

A partir dos resultados obtidos desta triagem, foi planejada a avaliação da concentração mínima inibitória.

O método foi utilizado como uma triagem no experimento para analisar o comportamento dos óxidos com as cepas bacterianas, se haveria inibição ou não e qual apresentaria maior sensibilidade aos óxidos para ser testado na etapa seguinte: concentração mínima inibitória.

4.2.2 Concentração mínima inibitória

Para esse experimento a técnica de diluição em caldo foi empregada conforme ANVISA (2008).

Para isso foi selecionada a linhagem *E. coli* CMIB 051 e preparados cinco tubos representando as diferentes concentrações do óxido onde as faixas de concentrações utilizadas foram de: 1, 2, 4, 6 e 8 g/L onde as quantidades isoladas podem ser observadas na Tabela 2 para todas as amostras. Cada tubo foi adicionado de 2mL de caldo Mueller-Hinton (MH) e 2mL da suspensão da linhagem selecionada preparada conforme ponto 0,5 McFarland, e a massa do óxido proporcional a concentração proposta.

Tabela 2. Faixa de concentrações e suas respectivas massas e volumes

Concentração g/L	volume (L)	massa(g)
8	0,004	0,032
6	0,004	0,024
4	0,004	0,016
2	0,004	0,008
1	0,004	0,004

Fonte: Autoria própria (2022)

Uma solução controle estéril contendo apenas o caldo MH e uma solução controle microbiológico contendo apenas o caldo MH e a suspensão microbiana foram preparados. As amostras e controles foram incubados a 165 rpm em uma estufa a 37°C/24h

Essa técnica foi realizada individualmente para cada óxido (Cu 100%, Zn 2,5%, Zn 5% e Zn 10% a 300°C e 400°C).

Para estimar a população microbiana de células totais foram realizadas medições de densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) 600 nm. Devido aos óxidos em solução apresentarem sua própria turvação, o que pode interferir nos resultados das análises, foi necessário o preparo de cinco soluções padrões com a mesma concentração das amostras que contém o microrganismo (1, 2, 4, 6 e 8), sendo essas soluções padrão compostas de 4mL do caldo MH e a massa de óxido respectiva a cada concentração, esses padrões foram incubados em estufa nas mesmas condições das amostras com os microrganismos.

Para obter a população de células viáveis foi utilizada a metodologia de plaqueamento em profundidade utilizando ágar MH a 37°C/48 horas em aerobiose com o limite de detecção da técnica de 25 a 250 UFC/mL.

4.3 Análises de caracterização do óxido de cobre dopado com zinco

Foram realizadas análises para caracterização do óxido de cobre dopado com zinco sendo ela a difração de raios X e microscopia eletrônica.

O difratômetro usado foi da marca PANalytical, modelo EMPYREAN (40 kV × 30 mA) com Cu K α ($\lambda_{K\alpha 1} = 1,5406 \text{ \AA}$, $\lambda_{K\alpha 2} = 1,5444 \text{ \AA}$, $I_{K\alpha 1}/I_{K\alpha 2} = 0,5$, em um intervalo de 20 a 130 (2θ), com uma varredura contínua em um passo de 0,026° (2θ) (aproximadamente 65 segundos por passo) e usando uma fenda de divergência de 0,76 mm. Um padrão externo de Si foi usado para obtenção das informações instrumentais. O Software GSAS (General Structure Analysis System) (LARSON; VON DREELE, 1994), com a interface EXPEGUI (TOBY, 2001) foi utilizado para o refinamento pelo método de Rietveld. (1969) Utilizou-se a função Thompson-Cox-Hastings pseudo-Voigt (pV – TCH) (YOUNG; DESAI, 1989) para o ajuste dos perfis. A correção da assimetria de reflexão devido à divergência axial foi feita pelo modelo descrito por Finger *et al.* (1994), a quantificação das fases cristalinas foi determinada usando a metodologia descrita por Hill e Howard (1987) e para relacionar o efeito da microdeformação utilizou-se o modelo fenomenológico descrito por Stephens (1999). As fichas cristalográficas usadas como base da ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) foram 53247 (Cu, Grupo espacial: $Fm\bar{3}m$, cúbico), 173982 (Cu₂O, Grupo Espacial: $Pn\bar{3}m$, cúbico), 43180 (CuO, Grupo Espacial: $C 1 2/c 1$; monoclínica) e 94002 (ZnO, Grupo Espacial: $P6_3cm$, hexagonal).

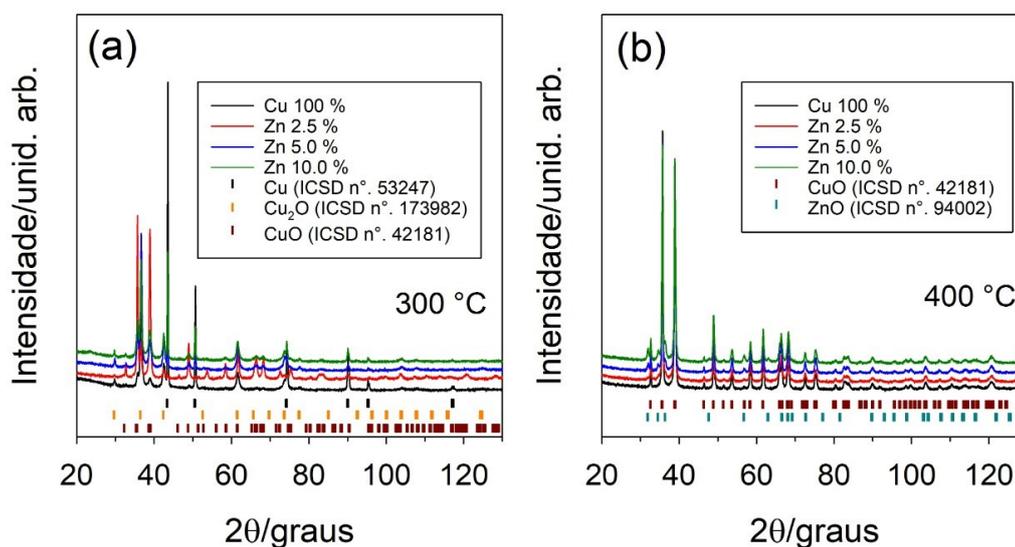
A análise morfológica foi por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, no qual utilizou-se do microscópio eletrônico de varredura da Zeiss (Modelo EVO-MA10), realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da UNILA. Foram obtidas imagens em diferentes faixas de magnificação e com a tensão do feixe de elétrons de 10 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Difração de raios x

Após a obtenção dos pós de óxido de cobre dopado com zinco, a primeira análise realizada foi a difração de raios X (Figura 7). A Figura 7(a) apresenta os difratogramas dos óxidos obtidos a 300 °C. Nesta temperatura de calcinação, observa-se a formação de 3 fases para a amostra pura (sem zinco), cobre metálico, óxido de cobre (I) (Cu_2O) e óxido de cobre (II) (CuO). Para as amostras com a presença de zinco, as mesmas fases foram observadas e nenhuma fase relacionada ao zinco foi observada. Este fato deve, provavelmente, estar relacionado com a incorporação do zinco nas estruturas das outras fases, agindo desta maneira como dopante. Quando a temperatura de calcinação foi de 400 °C (Figura 7(b)), apenas a fase CuO foi observada para a amostra Cu 100%, já para as outras amostras, com a presença de zinco, as fases CuO e ZnO foram observadas.

Figura 7. Difração de raios X das amostras em pó do óxido de cobre dopado com zinco em distinto tratamento térmico a (a) 300 °C e (b) 400 °C.



Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 3. Porcentagem em massa (wt%) das fases presentes nas amostras

Amostras	Porcentagem em massa (wt%)			
	Cu	Cu ₂ O	CuO	ZnO
Cu 100% (300 °C)	44,2(1)	45,9(2)	9,8(2)	-
Cu 100% (400 °C)	-	-	100,0	-
Zn 2,5% (300 °C)	0,866(5)	12,5(1)	86,56(3)	-
Zn 2,5% (400 °C)	-	-	97,72(6)	2,2(1)
Zn 5,0% (300 °C)	7,7(1)	52,8(2)	39,9(3)	-
Zn 5,0% (400 °C)	-	-	94,4(1)	5,5(8)
Zn 10,0% (300 °C)	14,8(1)	42,2(2)	42,8(2)	-
Zn 10,0% (400 °C)	-	-	90,11(2)	9,8(1)

Fonte: Autoria própria (2022)

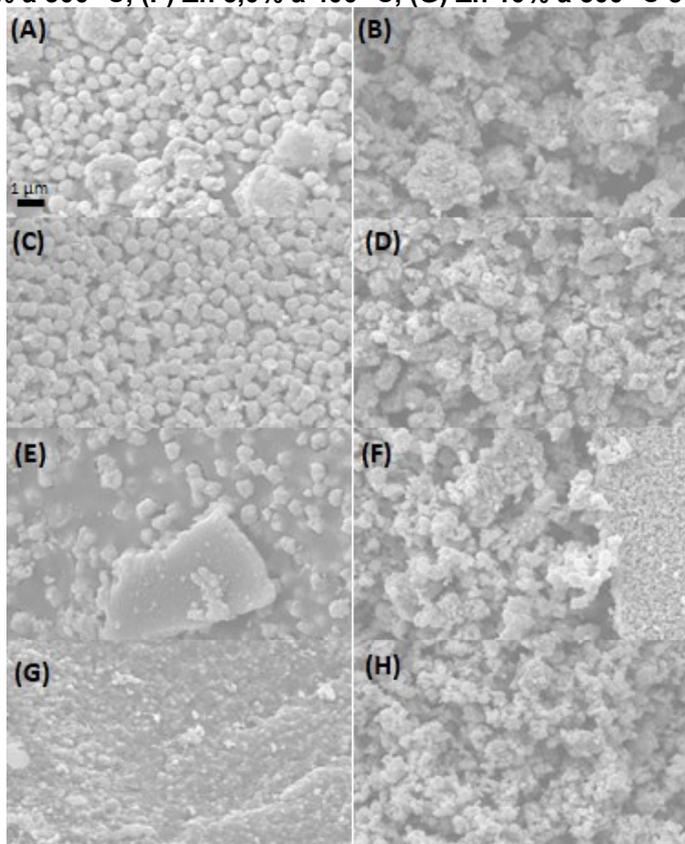
Para um melhor entendimento dos difratogramas de raios X, o método de refinamento por Rietveld (RIETVELD, 1969) foi utilizado. A Tabela 3 apresenta as porcentagens em massa (wt%) das fases presentes nas amostras obtidas através do refinamento por Rietveld. Para as amostras calcinadas a 300 °C, observa-se que as maiores porcentagens da amostra de Cu 100% foram as fases de cobre metálico (44,2%) e Cu₂O (45,9%), onde apenas 9,8% da fase CuO foi observada. Quando zinco foi adicionado em diferentes proporções nas amostras, observou-se um aumento significativo na porcentagem da fase CuO e uma diminuição da fase de cobre metálico, onde a porcentagem da fase Cu₂O foi mantida praticamente em valores muito próximos. A única exceção foi a amostra Zn 2,5 %, onde a fase majoritária encontrada foi a CuO (86,56%), uma quantidade muito menor da fase Cu₂O (12,5%) e menos do que 1% da fase de cobre metálico (0,866%).

Já para as amostras calcinadas a 400 °C, a fase majoritária encontrada foi a CuO, sendo a única fase na amostra Cu 100%. Nesta temperatura, as proporções de zinco adicionadas não entram como dopantes, como observado para as amostras calcinadas a 300 °C, e sim como uma nova fase de ZnO. No entanto, de maneira geral, pode-se afirmar que a presença de pequenas quantidades zinco, como as estudadas aqui, favorece a formação da fase CuO. Outra constatação também importante que pode ser feita é que a temperatura também favoreceu a formação da fase CuO.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura (mev)

Os pós obtidos através da metodologia de Pechini também foram caracterizados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), e as imagens representativas estão mostradas na Figura 8.

Figura 8. Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura dos óxidos obtidos. (A) Cu 100% a 300 °C, (B) Cu 100% a 400 °C, (C) Zn 2,5% a 300 °C, (D) Zn 2,5% a 400 °C, (E) Zn 5,0% a 300 °C, (F) Zn 5,0% a 400 °C, (G) Zn 10% a 300 °C e (H) Z



Fonte: Autoria própria (2022)

Para a amostra Cu 100% (300 °C), observou-se uma morfologia globular com partículas bem distribuídas com diâmetro na ordem de 500 nm (Figura 7(A)). O mesmo pode ser observado para a amostra Zn 2,5% (300 °C), ou seja, nesta porcentagem, a morfologia não foi alterada pela adição desta porcentagem de Zn. Já para amostra Zn 5,0% (300 °C), ainda pode ser observado algumas partículas esparsas com as mesmas características observadas para as amostras Cu 100% (300 °C) e Zn 2,5% (300 °C). Além disso, observa-se também o aparecimento de partículas globulares com um diâmetro muito menor ao já observado, o que é evidenciado para a amostra Zn 10% (300 °C), onde já não se observa as partículas com diâmetros maiores. Neste

sentido, de uma maneira geral, pode-se concluir que o diâmetro das partículas diminuiu com o aumento da porcentagem de Zn na amostra.

Já para as amostras com tratamento térmico a 400 °C, não se observou uma mudança clara quando a porcentagem de Zn foi aumentada, como já mencionada para as amostras a 300 °C. No entanto, quando as mesmas amostras são comparadas em temperaturas diferentes de tratamento térmico, de uma maneira geral, foi observado que o tamanho das partículas diminuiu.

5.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do composto foi testada inicialmente em duas diferentes cepas da *E. coli*, a linhagem 090 e a linhagem 051, como podem ser observados os resultados a seguir (Quadro 3).

Quadro 3. Diâmetro do halo de inibição para as diferentes cepas da *E. coli* e concentrações do óxido de cobre dopado com zinco.

Óxido	Temperatura de calcinação	Média do Diâmetro do halo (cm)	
		<i>E. coli</i> 090	<i>E. Coli</i> 051
CuO 100%	300°C	1,2 ± 0,34	2,53 ± 0,80
CuO 2,5% Zn	300°C	-	2,83 ± 0,76
CuO 5% Zn	300°C	-	3 ± 0
CuO 10% Zn	300°C	-	2,83 ± 0,29
CuO 100%	400°C	2,3 ± 0,57	2,66 ± 0,57
CuO 2,5% Zn	400°C	-	1,93 ± 0,11
CuO 5% Zn	400°C	-	1,86 ± 0,11
CuO 10% Zn	400°C	-	1,96 ± 0,47

Fonte: Autoria própria (2022)

Como resultado da etapa de triagem da avaliação da atividade antimicrobiana nas cepas *E. coli* 090, foi observado que apenas os compostos de óxido de cobre 100%, sem adição do zinco, apresentaram halo de inibição, tanto para a temperatura de 300°C quanto para 400°C. Já para a cepa *E. coli* 051 foi observado que todos os óxidos dopados com zinco e os Cu 100% apresentaram o halo de inibição. A partir desses dados o foi formulado de acordo com a presença ou ausência do halo de inibição, e caso presença o seu diâmetro.

Está apresentada na Figura 9 a imagem de uma placa referentes aos resultados do quadro acima:

Figura 9. Placa contendo o agente bactericida e seus respectivos apresentaram halo de inibição, a área do halo é representada pelo círculo vermelho.



Fonte: Autoria própria (2022)

Quanto ao comportamento das cepas e a sensibilidade em relação ao óxido, vemos que a linhagem 051 teve uma melhor interação quanto sensibilidade, já que apresentou o halo de inibição para todas as dopagens do óxido, sendo ela então a linhagem escolhida para ser utilizada na etapa de concentração mínima inibitória.

Na pesquisa de Mersian *et al* (2018) também foi empregado o óxido de cobre, entretanto o óxido foi dopado com zircônio. O óxido que foi obtido pela mesma via que o desse projeto, o método de pechini, foi testado na bactéria *E. Coli* onde obteve um halo de inibição de 10mm e o zircônio não teve influência significativa no aumento ou diminuição da zona de inibição, se mantendo em geral na mesma medida de 10mm.

Considerando os resultados que já foram apresentados numa comparativa vemos que para a linhagem 090 da *E. Coli*, os compostos que tinham a dopagem de zinco na sua composição não inibiram o crescimento de microrganismos, independente do tratamento térmico aplicado. Considerando que as amostras onde o CuO 100% foi utilizado se obteve inibição, podemos considerar a possibilidade de que a efetividade antimicrobiana do CuO 100% diminui à medida que o zinco foi adicionado.

Muitas hipóteses podem ser levantadas, primeiramente é importante saber como o óxido age na *E. coli* para causar a morte celular. Mersian *et al* (2018) afirma

que a morte celular na *E. coli* acontece por diferentes vias, uma delas as nanopartículas do composto metálico se dissolvem liberando cátions na superfície da célula bacteriana performando um stress oxidativo que o faz penetrar na membrana perturbando o padrão enzimático das células. Outra maneira é dissolução de nanopartículas metálicas, onde essas partículas são absorvidas pela membrana da bactéria e manipulam as atividades enzimáticas através da interação direta com grupos funcionais como as proteínas, grupos carboxila e ácidos nucleicos.

Como o óxido ataca as membranas da célula da bactéria para que ocorra a morte celular existe a possibilidade que a composição da membrana da linhagem 090 da *E. coli* seja uma causa, já que ela tem uma grande carga negativa na sua membrana e isso dificulta a penetração dos íons de radicais livres que fazem parte do óxido podendo causar os danos e morte celular (ARAB, 2018).

Apesar do mecanismo de interação das NPs com as células bacterianas ser relativamente incerto, existem trabalhos que demonstram o contrário do que aconteceu com a linhagem 090. Nesse caso a dopagem de zinco na verdade aumentou a atividade antimicrobiana do composto quando comparada ao CuO puro e isso se deve a produção de ROS (espécies de oxigênio reativo) que acontecem devido a introdução do Zn no sistema (IQBAIL *et al*, 2015).

Considerando os diferentes mecanismos que podem causar a destruição microbiana e que sua interação pode ser incerta, o fato da linhagem 051 ser inibida em todas as concentrações pode se considerar que se deve a alguns desses fatores, além disso a composição da sua membrana e parede celular podem afetar nessa atividade também, já que apesar de ser o mesmo microrganismo estudado, sua linhagem é diferente. Embora não se possa afirmar exatamente qual a sua composição celular ou suas diferenças para a linhagem 090, é uma possibilidade a ser considerada.

5.3.1 Concentração mínima inibitória

Para determinar a concentração mínima inibitória cinco concentrações diferentes contendo o óxido foram inoculadas e após o período de inoculação foi possível observar a turbidez oriunda do crescimento celular.

A análise da viabilidade celular da linhagem de *E. coli* CIMB051, após o período de 24 horas em contato os óxidos nas concentrações avaliadas, está apresentada na Tabela 4 e Tabela 5 para os tratamentos de 300 e 400°C, respectivamente.

Tabela 4. Resultados obtidos a partir do método de contagem das células totais para os óxidos com tratamento térmico a 300°C

Concentração (g/L)	Zn 2,5%	Zn 5%	Zn 10%	Cu 100%
Controle M.O	8,32	10,06	8,03	9,67
1	8,06	9,59	8,03	8,18
2	7,01	Indeterminado	7,16	8,18
4	7,52	6,48	6,86	6,81
6	Ausência	6,45	6,88	6,41
8	Ausência	5,85	6,45	Ausência

(*) Resultados expressos em log/UFC

Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 5. Resultados obtidos a partir do método de contagem das células totais para os óxidos com tratamento térmico a 400°C

Concentração (g/L)	Zn 2,5%	Zn 5%	Zn 10%	Cu 100%
Controle M.O	7,71	10,25	8,15	8,13
1	7,07	7,94	9,08	9,95
2	6,60	6,64	Ausência	8,11
4	7,21	7,12	Ausência	6,57
6	Indeterminado	6,51	Ausência	Ausência
8	6,43	6,64	Ausência	Ausência

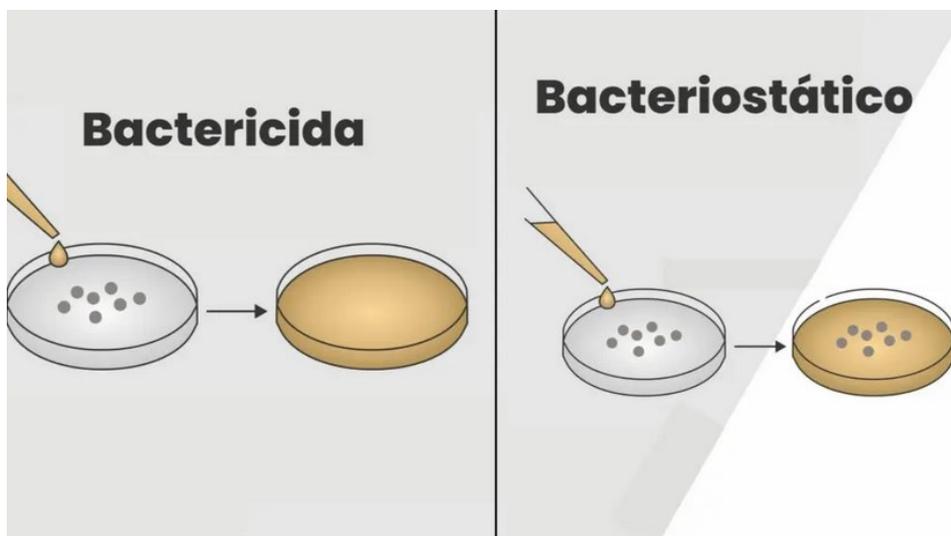
(*) Resultados expressos em log/UFC

Fonte: Autoria própria (2022)

Antes de se discutir os resultados obtidos é necessário abordar dois conceitos: bactericida e bacteriostático. Para um composto ser considerado bactericida ele deve destruir 99,9% das bactérias, matando o microrganismo por completo. Já para ser considerado bacteriostático o composto deve inibir o crescimento bacteriano mantendo as bactérias na sua fase estacionária, mas não as destruindo por completo, podendo chegar até 99% de destruição. Compostos antimicrobianos podem ser ambos bactericidas e bacteriostáticos ao mesmo tempo e sua atividade pode ser influenciada pela densidade bacteriana, condições do

crescimento e duração do teste (PANKEY; SABATH, 2004). Na figura 10 um exemplo prático pode ser observado:

Figura 10. Representação gráfica da diferença entre bactericida e bacteriostático



Fonte: TNS nano, 2022.

Considerando esses conceitos e analisando as tabelas vemos que os compostos têm ambas as atividades, bactericida e bacteriostática, uma vez que vemos que em determinadas concentrações houve ausência de crescimento de acordo com o limite de detecção da técnica, mas também em outras concentrações houve apenas a diminuição da população microbiana.

Isso significa que as concentrações 6g/L e 8g/L do Zn 2,5% a 300°C e a concentração 8g/L do Cu 100% a 300°C apresentaram atividade bactericida. Para as demais dopagens se observa uma atividade bacteriostática já que há uma redução de 41,84% da população para o Zn 5% e 19,67% para o Zn 10% ambos a 300°C.

Já para os óxidos com tratamento térmico a 400°C, com o Zn 10% a atividade bactericida foi a partir da concentração de 2g/L, apresentando também para as concentrações 4g/L, 6g/L e 8g/L. Para o CuO 100% se observa atividade bactericida a partir da concentração 6g/L, apresentando também para a 8g/L. Para as demais dopagens tivemos uma atividade bacteriostática com uma redução de população de 36,48% para o Zn 5% e 16,6% para o Zn 2,5%.

É importante ressaltar que os campos que apresentam como 'indeterminado' sendo eles: concentração 2g/L Zn 5% a 300°C e concentração 6g/L Zn 2,5% a 400°C, foram amostras que apresentaram um erro, assim como as amostras que não

seguiram a redução de população como esperado. O erro pode ter sido de homogeneização das amostras, uma vez que essa etapa é imprescindível para o sucesso da técnica, e mesmo os ensaios tendo sido repetidos para possível correção os resultados seguiram os mesmos.

Quanto a concentração mínima inibitória, que determina a menor quantidade de um agente bactericida necessária para inibir o crescimento microbiano (De Freitas *et al*, 2009) para as amostras com tratamento térmico a 300°C temos: concentração 6g/L para Zn 2,5% e concentração 8g/L para o CuO 100%. Já para as amostras com tratamento térmico a 400°C temos: concentração 2 g/L para o Zn 10% e 6 g/L para o CuO 100%, os resultados da concentração mínima inibitória podem ser observados na Tabela 6:

Tabela 6. Concentração mínima inibitória para os óxidos com tratamento térmico a 300 e 400°C

Óxido	Temperatura de calcinação	Concentração (g/L)
Zn 2,5%	300°C	6
Cu 100%	300°C	8
Zn 10%	400°C	2
Cu 100%	400°C	6

Fonte: Autoria própria (2022)

Analisando esses resultados vemos que a presença do Zn a 10% tornou o óxido mais eficiente quando comparado ao controle de Cu no tratamento a 400°C. Para as demais concentrações de Zn é difícil afirmar se houve maior eficiência quando comparado ao controle, devido a variabilidade dos resultados e a temperatura de 400°C apresenta um efeito maior sobre a inibição, quando comparada aos tratamentos a 300°C.

No trabalho realizado por Arab (2018) onde NPs de ZnO e CuO foram testadas separadamente para a *E. coli* a atividade bacteriostática chegou ao máximo de 90% e nenhuma das concentrações atingiu atividade bactericida. Apesar de não ter tido atividade bactericida sua atividade bacteriostática se apresentou superior quando comparadas a desse trabalho, tendo uma grande redução da população microbiana, entretanto o método e o tratamento empregado nas NPs foi diferente. É importante afirmar que as concentrações utilizadas eram menores quando comparado com as utilizadas nesse trabalho, e a autora afirma que se a concentração fosse aumentada poderia apresentar atividade bactericida.

Então fazendo uma breve análise e comparação vemos que o método de síntese das NPs da autora pode ter contribuído para a atividade bacteriostática, mas as concentrações empregadas não foram suficientes para a atividade bactericida em contrapartida nesse trabalho tivemos diversas concentrações bactericidas, mas a atividade bacteriostática foi menor. O que pode se concluir que a concentração influencia diretamente a atividade bactericida além de também seu método de síntese e tratamento.

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados na seção anterior, as referências de literatura utilizadas e os objetivos gerais e específicos propostos, pode se concluir que:

- A diferença entre as linhagens influencia na interação com os óxidos e na sua atividade antimicrobiana
- A *E. coli* 051 foi a linhagem que obteve melhor resultado e interação com os óxidos quanto a sua atividade antimicrobiana;
- Os óxidos apresentaram tanto atividade bacteriostática quanto bactericida;
- Parâmetros como temperatura e dopagem do zinco influenciam na sua atividade antimicrobiana;
- A temperatura de calcinação de 400°C obteve-se o melhor resultado quanto a atividade antimicrobiana;
- O CuO dopado de Zn a 10% com tratamento a 400°C foi o mais eficiente, já que apresentou atividade bactericida para quatro concentrações diferentes demonstrando que para esse óxido e o tratamento térmico houve uma correlação entre a concentração e a inibição do crescimento bacteriano;
- Foi possível obter um óxido dopado com diferentes concentrações de zinco a partir do método de Pechini que apresenta atividade bactericida.

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, S.; The discovery and development of penicillin 1928-1945: **The Alexander Fleming Laboratory Museum**, London, UK, November 19, 1999: An International Historic Chemical Landmark, American Chemical Society, Washington, D.C. 1999.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, 2007.
- ALI, A.; PHULL, A. R.; ZIA, M. Elemental zinc to zinc nanoparticles: Is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 5, p. 413–441, 2018. De Gruyter. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrev-2018-0067/html?lang=en>>. Acesso em: 11/7/2022.
- ALLAKER, R. P. Nanoparticles and the control of oral biofilms. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**. p.203–227, 2012. Elsevier Inc.
- ALLOCATI, N.; *et al.* Escherichia coli in Europe: An overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2013, Vol. 10, Pages 6235-6254, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, 2013. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6235/htm>>. Acesso em: 29/6/2022.
- ANTECKA, K.; *et al.* Synergistic degradation of dye wastewaters using binary or ternary oxide systems with immobilized laccase. **Catalysts**, v. 8, n. 9, p. 402, 2018. Catalysts.
- ANVISA. **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**, 2008. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/referencias.htm>. Acesso em: 24/11/2022.
- ARAB, F.E. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**, 2018.
- ASHE, B. A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and silver nanoparticles in biological system (Doctoral dissertation), **National Institute of Technology**, 2011
- BRITO A., L., BRAGA, N. A. Nanopartículas de TiO₂: síntese pelo método sol-gel e técnicas de caracterização. **Scientia Amazonia**, 2, 36–59. 2015 <http://www.scientia.ufam.edu.br>.

CENTRO DE INFORMAÇÃO E RESPOSTAS ESTRATÉGICAS DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- CIEVS. **Informe epidemiológico CIEVS-Paraná**. Secretaria do Estado da Saúde do Paraná, 2017.

CHAMPI, A.; MARQUES, F. C. Structural changes in amorphous carbon nitride films due to bias voltage. **Thin Solid Films**, v. 501, n. 1–2, p. 362–365, 2006. Elsevier.

COLON, G.; WARD, B. C.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78A, n. 3, p. 595–604, 2006. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.30789>>. Acesso em: 11/7/2022.

COPPER(I) Oxide - Structure, Properties and Uses of Cu₂O. Disponível em: <<https://byjus.com/chemistry/copper-oxide/>>. Acesso em: 6/6/2021.

COSTA, L. M. M., *et al.* **Eletrofiação de nanofibras de PVDF com nanopartículas de prata e de prata/dióxido de titânio para aplicações antimicrobiais**, 2009

COSTA, J. M. **Avaliação das propriedades fotocatalíticas e antimicrobianas da solução sólida (Mg,Zn) 2 SnO 4 obtida pelo método de Pechini modificado**. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, programa de pós-graduação em química, 2019.

CRETU, V.; *et al.* Synthesis, characterization and DFT studies of zinc-doped copper oxide nanocrystals for gas sensing applications. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 17, p. 6527–6539, 2016. Royal Society of Chemistry.

FINGER, L. W.; COX, D. E.; JEPHCOAT, A. P. A, *Correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence*, **Journal of Applied Crystallography**, v. 27, p. 892-900, 1994.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33(3), 667–679, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

HALBUS, A. F.; HOROZOV, T. S.; PAUNOV, V. N. Strongly enhanced antibacterial action of copper oxide nanoparticles with boronic acid surface functionality. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 13, p. 12232–12243, 2019.

HARIKUMAR, P.; ARAVIND, A. Antibacterial activity of copper nanoparticles and copper nanocomposites against Escherichia coli bacteria. **Article in International Journal of Sciences**, 2016. Disponível em: <<http://www.ijsciences.com/pub/issue/2016-02/>>.

HEINLAAN, *et al.* Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308–1316, 2008. Pergamon.

HILL, R. J.; HOWARD, C.J. Quantitative phase-analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method, **Journal of Applied Crystallography**, Vol. 20, No. 6, p. 467-474, 1987.

GUMBART, J. C.; *et al.* B. Escherichia coli peptidoglycan structure and mechanics as predicted by atomic-scale simulations. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 2, p. 1003475, 2014. PLOS. Disponível em: </pmc/articles/PMC3930494/>. Acesso em: 7/12/2022.

GUO, J.; *et al.* Sonochemical synthesis of TiO₂ nanoparticles on graphene for use as photocatalyst. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 1082–1090, 2011. Elsevier.

IQBAL, J.; *et al.* Facile synthesis of Zn doped CuO hierarchical nanostructures: Structural, optical and antibacterial properties. **AIP Advances**, v. 5, n. 12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4937907>.

JANOTTI, A.; WALLE, C. G. V. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. **Reports on Progress in Physics**, v. 72, n. 12, p. 126501, 2009. IOP Publishing. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/72/12/126501>. Acesso em: 11/7/2022.

JIA, X.; *et al.* Small molecular target-based multifunctional upconversion nanocomposites for targeted and in-depth photodynamic and chemo-anticancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109849, 2019. Elsevier.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology** 2004 2:2, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004. Nature Publishing Group. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>. Acesso em: 29/6/2022.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017. Wolters Kluwer -- Medknow Publications. Disponível em: </pmc/articles/PMC5672523/>. Acesso em: 7/12/2022.

KHAN, A. **Synthesis, characterization and luminescence properties of zinc oxide nanostructures**. 2006.

KLAPISZEWSKI, Ł.; *et al.* The controlled oxidation of kraft lignin in mild conditions using ionic liquid as a crucial point in fabrication of antibacterial hybrid materials. **Journal of Molecular Liquids**, v. 274, p. 370–378, 2019. Elsevier.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010. Nature Reviews Microbiology.

LARSON, A.C; DREELE, R.B. V., General Structure Analysis System (GSAS), **Los Alamos National Laboratory Report LAUR 86-748**, 1994.

LEE, S. S.; *et al.* Novel-structured electrospun TiO₂/CuO composite nanofibers for high efficient photocatalytic cogeneration of clean water and energy from dye wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 4059–4073, 2013. Pergamon.

LEWIS, K., The science of antibiotic discovery. **Cell**, 181(1), pp.29-45. 2020.

LV, Y.; *et al.* Synthesis and evaluation of the structural and antibacterial properties of doped copper oxide. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 15, p. 4699–4709, 2020. Royal Society of Chemistry.

MANDELA, N. Lighting your way to a better future. **Planetarium. University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa**. July 16th 2003.

MERSIAN, H.; ALIZADEH, M.; HADI, N. Synthesis of zirconium doped copper oxide (CuO) nanoparticles by the Pechini route and investigation of their structural and antibacterial properties. **Ceramics International**, v. 44, n. 16, p. 20399–20408, 2018. Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l.

MI, G.; *et al.* Reducing bacterial infections and biofilm formation using nanoparticles and nanostructured antibacterial surfaces. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–23, 2018.

MODY, V.; *et al.* Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282, 2010. Medknow.

NASCIMENTO, R. D. M.; ANDRADE, L. G. Infecção hospitalar e multirresistência bacteriana. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 3, p. 1289–1299, 2022. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/4700>>. Acesso em: 26/6/2022.

NEUBEISER, A.; *et al.* Mortality attributable to hospital acquired infections with multidrug-resistant bacteria in a large group of German hospitals. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 204–210, 2020. Elsevier.

NEUMARK, G.; GONG, Y.; KUSKOVSKY, I. Doping aspects of Zn-based wide-band-gap semiconductors. **Springer Handbooks**, p. 843–854, 2006. Springer, Boston, MA. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-0-387-29185-7_35>. Acesso em: 11/7/2022.

O'NEILL J., Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **London: Review on Antimicrobial Resistance**. 2016.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004. Oxford Academic. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/38/6/864/320723>>. Acesso em: 8/12/2022.

PECHINI, M. P., **US Patent US3330697A**, 1967

POLITANO, A. D.; *et al.* Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. **Surgical Infections**, v. 14, n. 1, p. 8–20, 2013. Surgical Infections.

RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4020–4028, 2011. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la104825u>>. Acesso em: 11/7/2022.

RAJESHWAR, K.; *et al.* Review—Copper oxide-based ternary and quaternary oxides: where solid-state chemistry meets photoelectrochemistry. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 4, p. H3192–H3206, 2018. The Electrochemical Society. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0271804jes>>. Acesso em: 11/7/2022.

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 1969. International Union of Crystallography (IUCr). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1107/S0021889869006558>>. Acesso em: 11/7/2022.

RODRIGUES, E. N. L., OLIVEIRA, M. M., MIRANDA, E. J. P. **Obtenção de nanopartículas a base de zircônia e prata pelo método pechini para aplicação bactericida em microorganismos como a escherichia coli e staphylococcus aureus**, 2013.

ROWLETT, V. W.; *et al.* Impact of membrane phospholipid alterations in Escherichia coli on cellular function and bacterial stress adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 13, 2017. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <[pmc/articles/PMC5472821/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3122821/)>. Acesso em: 7/12/2022.

SANTOS, D., *et al.* **Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana**, 2018. Disponível em: <https://revista.saojose.br/index.php/cafsj/article/view/240>

SCHMIDT-MENDE, L.; MACMANUS-DRISCOLL, J. L. ZnO – Nanostructures, defects, and devices. **Materials Today**, v. 10, n. 5, p. 40–48, 2007. Elsevier.

SEVINÇ, B. A.; HANLEY, L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 94B, n. 1, p. 22–31, 2010. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.b.31620>>. Acesso em: 11/7/2022.

SONG, W.; *et al.* Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 3, p. 389–397, 2010. Elsevier.

SOUZA, D. R.; *et al.* TiO₂ Synthesis by the Pechini's method and application for diclofenac photodegradation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 1, p. 32–

39, 2021. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/php.13355>>. Acesso em: 11/7/2022.

SILVA, B. L.; *et al.* Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An Overview. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9395, 2019. Dove Press. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6897062/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306897062/)>. Acesso em: 30/6/2022.

SIRELKHATIM, A.; *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015. SpringerOpen.

STEPHENS P. W., IUCr, Phenomenological model of anisotropic peak broadening in powder diffraction, **Journal of Applied Crystallography**, 32 281–289, 1999.

TAKAMUNE, L. F.; VIEIRA, D. C. M. Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: Método de difusão em ágar e método de espalhamento. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 555–558, 2013.

TENDENCIA, E. A. Disk diffusion method. In **Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment** (pp. 13-29). Tigbauan, Iloilo, Philippines 2004, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

TOBY, B., H., *EXPGUI, a graphical user interface for GSAS*, **Journal of Applied Crystallography**, v.34, P. 210-213, 2001.

TNS Nano. Bactericida vs. Bacteriostático -. Disponível em: <<https://tnsnano.com/chem/bactericida-vs-bacteriostatico/>>. Acesso em: 8/12/2022.

WANG, Z.; ZHAO, Y. High-pressure microscopy. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1149–1150, 2006. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1127181>>. Acesso em: 11/7/2022.

WONG, S. W. Y.; *et al.* Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** **2009 396:2**, v. 396, n. 2, p. 609–618, 2009. Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-009-3249-z>>. Acesso em: 11/7/2022.

WEBSTER, T. J.; SEIL, I. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2767, 2012. International Journal of Nanomedicine.

YADAV, V., Nanotechnology, big things from a tiny world: a review. **AEEE** 3(6), 771–778 (2013).

YOUNG, R. A.; DESAI, P. Crystallite size and microstrain indicators in Rietveld Refinement, **Archiwum Nauki o Materialach**, v. 10, p. 71-90, 1989.

ZHANG, Y.; *et al.* Synthesis, characterization, and applications of ZnO nanowires. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 22, 2012. Hindawi limited PUB1800 London, UK, United Kingdom. Disponível em:
<<https://dl.acm.org/doi/abs/10.1155/2012/624520>>. Acesso em: 11/7/2022.